

5193 Popus 4A
IR-PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

DEPARTEMEN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN
DIREKTORAT JENDERAL PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS AIRLANGGA

OPTIMASI KONDISI AMOBILISASI
GLUKOAMILASE MENNGUNAKAN PADATAN
PENDUKUNG BENTONIT BENTUK ION
UNTUK KONVERSI PATI MENJADI GLUKOSA

Ketua Peneliti :

Dra. Afaf Baktir, MS.



LEMEAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Dibiayai Oleh : DRK DPP Unair 1994/1995

SK.Rektor Nomor : 4815/PT03.H/N/1994

Nomor : 24

IR-PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

DEPARTEMEN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN
DIREKTORAT JENDERAL PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS AIRLANGGA

KK'S
KK
547.7813
Bak
0-2

**OPTIMASI KONDISI AMOBILISASI
GLUKOAMILASE MENNGUNAKAN PADATAN
PENDUKUNG BENTONIT BENTUK ION
UNTUK KONVERSI PATI MENJADI GLUKOSA**

Ketua Peneliti :

Dra. Afaf Baktir, MS.



3000127963141-1

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA



30001279631412

LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Dibiayai Oleh : DRK DPP Unair 1994/1995

SK.Rektor Nomor : 4815/PT03.H/N/1994

Nomor : 24

LP

Optimasi Kondisi Amobilisasi Glukoamilase Menggunakan Padatan Pendukung Afaf Baktir
Bentonit Bentuk Ion Untuk Konversi Pati Menjadi Glukosa

SELESAI

DEPARTEMEN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN
DIREKTORAT JENDERAL PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS AIRLANGGA

**OPTIMASI KONDISI AMOBILISASI
GLUKOAMILASE MENGGUNAKAN PADATAN
PENDUKUNG BENTONIT BENTUK ION
UNTUK KONVERSI PATI MENJADI GLUKOSA**

Peneliti :

Dra. Afaf Baktir, MS

Dra. Sri Sumarsih

Drs. Hamami

Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

3000127963141

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Dibiayai : SPP/DPP Tahun 1994/1995

SK. Rektor Nomor: 4815/PT.03.H/N/1994

Tanggal: 27 Juni 1994

Nomor Urut: 24



LEMBAGA PENELITIAN

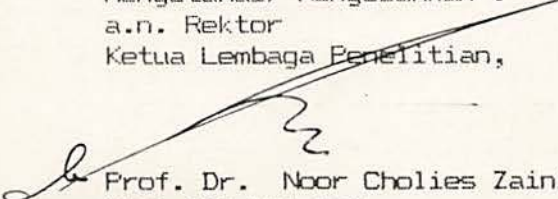
Jl. Darmawangsa Dalam 2 Telp. (031) 42322 Surabaya 60286

IDENTITAS DAN PENGESAHAN
LAPORAN AKHIR HASIL PENELITIAN

1. a. Judul Penelitian : Optimasi Kondisi Amobilisasi Glukoamilase Menggunakan Padatan Pendukung Bentonit Untuk Konversi Pati Menjadi Glukosa
- b. Macam Penelitian : Fundamental, Terapan, Pengembangan
 Institusional
- c. Katogori Penelitian : I II III IV
2. Kepala Proyek Penelitian
 - a. Nama Lengkap Dengan Gelar : Dra. Afaf Baktir, M.S.
 - b. Jenis Kelamin : W a n i t a
 - c. Pangkat/Golongan dan NIP : Penata/IIIc/131 286 710
 - d. Jabatan Sekarang : Staf Pengajar
 - e. Fakultas / Jurusan : FMIPA/Kimia
 - f. Univ./Inst./Akademi : Universitas Airlangga
 - g. Bidang Ilmu Yang Diteliti : Biokimia
3. Jumlah Tim Peneliti : 3 (tiga) orang
4. Lokasi Penelitian : Lab. Kimia Organik/Biokimia FMIPA Unair
5. Kerjasama dengan Instansi Lain
 - a. Nama Instansi :
 - b. A l i a m a t :
6. Jangka Waktu Penelitian : 8 (delapan) bulan
7. Biaya Yang Diperlukan : Rp 2.000.000,00
8. Seminar Hasil Penelitian : 27 Februari 1995
 - a. Dilaksanakan Tanggal Baik Sekali B a i k
 - b. Hasil Penelitian S e d a n g K u r a n g

Surabaya, 15 April 1995

Mengetahui/ Mengesahkan :
a.n. Rektor
Ketua Lembaga Penelitian,


Prof. Dr. Noor Cholies Zainif
NIP. 130 355 372

KATA PENGANTAR

Puji syukur ke hadirat ALLAH SWT. yang telah memberikan rahmatNYA sehingga penelitian kami yang berjudul " *Optimasi Kondisi Amobilisasi Glukoamilase Menggunakan Padatan Pendukung Bentonit Bentuk Ion Untuk Konversi Pati Menjadi Glukosa*" dapat diselesaikan.

Pada kesempatan ini kami menyampaikan terima kasih kepada :

1. Ketua Lembaga Penelitian Universitas Airlangga, yang telah memberi kesempatan kepada kami untuk melaksanakan penelitian ini;
2. Dekan Fakultas MIPA Univesitas Airlangga, yang telah memberi kesempatan dan fasilitas penelitian;
3. Ketua Laboratorium Kimia Organik dan Ketua Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Airlangga, yang telah memberi pengarahan atau saran-saran;
4. semua pihak yang telah membantu kami.

Kritik dan saran kami harapkan demi kesempurnaan tulisan ini. Semoga penelitian ini dapat memberikan manfaat.

Surabaya, Pebruari 1995

Tim Peneliti

RINGKASAN

Judul Penelitian : Optimasi Kondisi Amobilisasi Glukoamilase Menggunakan Padatan Pendukung Bentonit Bentuk Ion Untuk Konversi Pati Menjadi Glukosa

Ketua Peneliti : Afaf Baktir

Anggota Peneliti : Sri Sumarsih
Hamami

Fakultas / Puslit : FMIPA

Sumber Biaya : SPP/DPP Universitas Airlangga Th 1994/
1995
SK. Rektor Nomor 4815/PT.03.H/N/1994
Tanggal 27 Juni 1994

Produksi gula dari bahan baku pati masih diperlukan untuk mencukupi kebutuhan gula di Indonesia. Di industri, konversi pati menjadi glukosa dikerjakan secara enzimatis, yang melibatkan glukoamilase. Dalam hal ini enzim dapat digunakan dalam bentuk larut (mobil) atau bentuk tidak larut (amobil).

Pemakaian enzim amobil merupakan terobosan baru yang sedang berkembang saat ini karena sangat ekonomis, yaitu memungkinkan penggunaan ulang enzim dan proses konversi secara sinambung. Salah satu cara pembuatan enzim amobil yang mudah dan aman bagi enzim, adalah pengikatan enzim secara ionik pada resin yang harganya mahal dan sukar didapatkan.

Bentonit merupakan tanah lempung yang murah dan mudah diperoleh, dapat memiliki sifat seperti resin bila diaktivasi.

Penelitian ini bertujuan menentukan perlakuan dan kondisi optimum untuk pengikatan glukoamilase pada bentonit, dan meneliti kemampuan glukoamilase amobil yang diperoleh dalam menghidrolisis pati.

Dilakukan tiga cara aktivasi bentonit, sehingga diperoleh tiga jenis bentonit, yaitu *bentonit aktif* (berkemampuan mengadsorpsi secara fisik), *bentonit penukar kation $B-NH_4$* dan *$B-N^+$* (berkemampuan mengikat secara ionik). Kemudian dilakukan kontak antara bentonit yang telah diaktivasi dan glukoamilase pada kondisi-kondisi (pH, konsentrasi, suhu, lama kontak) yang

bervariasi untuk penentuan kondisi optimumnya. Setelah dilakukan kontak bentonit dan amilase pada kondisi optimum tersebut, maka glukamilase amobil yang diperoleh dilakukan uji kekuatan ikatan dan uji kemampuan menghidrolisis pati.

Kesimpulan dari hasil penelitian ini adalah (1) bentonit dapat digunakan sebagai materi pendukung untuk glukamilase amobil dalam bentuk *penukar kation B-H*, (2) Kondisi optimum pengikatan bentonit dan glukamilase adalah: pH 5,5; suhu 25°C, lama kontak 30 menit, (3) Kolom glukamilase amobil yang diperoleh (berukuran tinggi 1 cm diameter 2,5 cm) memiliki kemampuan mengkonversi pati menjadi gula dengan derajat konversi 19,88 %.

Disarankan agar meneliti panjang kolom glukamilase amobil yang dapat mengkonversi pati menjadi gula dengan derajat konversi 100 %, kemudian mengembangkan metode ini untuk skala industri.

DAFTAR ISI

	halaman
KATA PENGANTAR	i
RINGKASAN PENELITIAN	ii
DAFTAR ISI	iv
DAFTAR TABEL	vi
DAFTAR GAMBAR	viii
BAB I. PENDAHULUAN	
1.1. Latar Belakang Permasalahan	1
1.2. Perumusan Masalah	3
1.3. Tujuan Penelitian	3
1.4. Manfaat Penelitian	3
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1. Glukoamilase	4
2.2. Lempung	6
2.3. Teknik Amobilisasi Enzim	13
BAB III. METODE PENELITIAN	
3.1. Bahan Penelitian dan Alat	16
3.2. Cara Kerja	16
3.2.1. Pembuatan <i>bentonit aktif</i>	17
3.2.2. Pembuatan <i>bentonit penukar kation</i>	18
3.2.3. Persiapan amilase	18

3.2.4. Penentuan kondisi optimum pengikatan bentonit-amilase	21
3.2.5. Uji kekuatan adsorpsi fisik bentonit-amilase	24
3.2.6. Uji kekuatan ikatan ionik bentonit-amilase	24
3.2.7. Uji aktivitas amilase amobil secara sinambung	25
BAB IV. HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	
4.1. Persiapan Glukoamilase	26
4.2. Aktivitas Amilase	26
4.3. Kadar Protein Dalam Ekstrak Amilase	27
4.4. Hasil Penentuan Kondisi Optimum Pengikatan Amilase Pada Bentonit	29
4.5. Hasil Uji Kekuatan Adsorpsi Fisik Bentonit-Amilase	33
4.6. Hasil Uji Kekuatan Ion Bentonit-Amilase	34
4.7. Hasil Uji Aktivitas Amilase Secara Sinambung	36
BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN	38
DAFTAR PUSTAKA	39

DAFTAR TABEL

	halaman
Tabel 4.1. Data serapan larutan glukosa standar pada 520 nm	26
Tabel 4.2. Data hasil uji aktivitas amilase	27
Tabel 4.3. Data serapan larutan tirosin standar pada 280 nm	28
Tabel 4.4. Data hasil penentuan kadar protein ekstrak amilase	28
Tabel 4.5. Data kadar protein yang lolos selama prosedur pembilasan amilase amobil dengan pendukung bentonit B-NH ₄ ⁺ dan B-H ⁺	29
Tabel 4.6. Kadar protein yang lolos selama prosedur peng- ikatan amilase oleh bentonit pada berbagai suhu	30
Tabel 4.7. Kadar protein yang lolos selama prosedur pengikat- an amilase oleh bentonit penukar kation pada lama kontak yang berbeda	31
Tabel 4.8. Kadar protein yang lolos selama prosedur pengikat- an amilase oleh bentonit aktif pada lama kontak yang berbeda	31
Tabel 4.9. Kadar protein yang lolos selama pengikatan amilase oleh bentonit penukar kation pada berbagai pH	32
Tabel 4.10. Kadar protein yang diadsorpsi oleh bentonit pada prosedur pengikatan menggunakan larutan amilase	

pada kadar berbeda-beda	33
Tabel 4.11. Protein yang lolos dalam bilasan I-V selama pembilasan amilase amobil (adsorpsi fisik)	33
Tabel 4.12. Protein yang lolos pada bilasan I-IV menggunakan pembilas larutan amilum dengan variasi kadar, selama pembilasan amilase amobil (ikatan ionik)	35
Tabel 4.13. Kadar gula efluen pada uji aktivitas amilase amobil secara sinambung	36
Tabel 4.14. Data hasil penentuan kadar protein yang lolos dalam efluen selama uji aktivitas kolom amilase amobil	37

DAFTAR GAMBAR

	halaman
Gambar 2.1. Skema mekanisme hidrolisis pati oleh amilase	4
Gambar 2.2. Hablur lempung berbentuk bilah yang terdiri dari permukaan luar dan dalam	7
Gambar 2.3. Struktur lempung monmorilonit	9
Gambar 2.4. Klasifikasi enzim amobil berdasarkan sifat interaksi enzim-materi pendukung dan sifat materi pendukung	14
Gambar 3.1. Alat untuk aktivasi bentonit	17
Gambar 4.1. Kurva standar glukosa	27
Gambar 4.2. Kurva standar tirosin	28

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar belakang masalah

Konsumsi gula di Indonesia melebihi kapasitas produksinya, disebabkan oleh terbatasnya areal yang sesuai untuk tanaman padi. Pemerintah berusaha mencukupi dengan jalan impor gula. Tahun 1980 impor gula mencapai 500.000 ton, dengan besar subsidi Rp 70,- per kg. Oleh karena itu sangat perlu didirikan pabrik-pabrik gula non sukrosa, misal gula dari bahan baku pati (Tjokroadikusumo, 1986).

Konversi pati menjadi glukosa dapat diselenggarakan oleh enzim. Keuntungannya, reaksi enzimatik berlangsung pada kondisi lunak (suhu rendah, tidak perlu suasana yang sangat asam) dan selektif sehingga reaksi samping tidak terjadi, maka kualitas produk hidrolisis jauh lebih baik dibanding hidrolisis menggunakan asam (Tjokroadikusumo, 1986).

Dalam suatu proses produksi secara enzimatik, enzim dapat digunakan dalam bentuk terlarut (mobil) atau bentuk tidak larut (amobil). Bentuk enzim amobil merupakan terobosan baru yang sedang dikembangkan saat ini (Wiseman, 1985).

Apabila digunakan glucoamilase bentuk terlarut, proses hidrolisis pati harus secara *batch* (bertahap) sehingga produk hidrolisis (glukosa) masih bercampur dengan enzim. Maka diperlukan tahap non aktivasi (perusakan) enzim, yang dilanjutkan dengan tahap pemurnian glukosa. Cara demikian tidak ekonomis. Adapun penggunaan glucoamilase bentuk amobil memungkinkan proses

sinambung, sehingga produk hidrolisis langsung murni dan enzim tidak perlu dirusak sehingga dapat dipakai berulang kali. Proses sinambung juga penting untuk kestabilan enzim, karena enzim tidak terendam / terkontaminasi oleh produk (Wiseman, 1985).

Salah satu cara pembuatan enzim amobil yang mudah dikerjakan adalah pengikatan enzim secara ionik pada materi pendukung yang berupa polimer tidak larut air. Selama ini yang banyak dipakai adalah resin, suatu senyawa semi sintesis yang harganya sangat mahal (Chibata, 1978). Oleh karena itu dicari senyawa pendukung lain dengan kemampuan serupa yang berasal dari sumber bahan alam. Dengan demikian harga enzim amobil, khususnya glukamilase amobil dapat ditekan, dan ongkos produksi gula dari pati dalam skala industri dapat bersaing dengan produksi gula tebu.

Bentonit adalah lempung yang mengandung 85-90% monmorilonit, terdapat berlimpah di Indonesia dan murah. Permukaannya dapat berkarakter kationik atau anionik tergantung cara pengaktifannya (Setiadji, 1989). Sifat serupa juga dimiliki oleh enzim, sebagai protein globular yang berupa elektrolit, makromolekul ini permukaannya dapat bermuatan positif atau negatif tergantung kondisi pH. Pada pH di bawah pH isoelektrik enzim bermuatan positif, sedang di atas pH isoelektrik enzim bermuatan negatif. Sifat demikian memungkinkan bentonit dipakai sebagai pendukung untuk amobilisasi enzim yang muatannya berlawanan melalui ikatan ion. Faktor penting dalam amobilisasi di sini adalah pH optimum

enzim, yaitu pH yang mendukung enzim beraktivitas maksimum. Untuk glukoamilase amobil memiliki pH optimum sekitar 5,5 (5-6).

2.2. Perumusan Masalah

Dari latar belakang masalah yang telah diuraikan timbul permasalahan sebagai berikut .

1. Dapatkah bentonit digunakan sebagai materi pendukung untuk amobilisasi glukoamilase ?
2. Pada kondisi (pH, suhu, konsentrasi glukoamilase, dan bentuk bentonit) bagaimana daya ikat bentonit terhadap glukoamilase maksimal ?
3. Bagaimana kemampuan glukoamilase amobil yang diperoleh dalam menghidrolisis pati secara sinambung ?

2.3. Tujuan penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk menentukan :

1. kondisi optimum (pH, suhu, konsentrasi glukoamilase, dan bentuk bentonit) yang memberikan daya ikat maksimal antara bentonit dan glukoamilase
2. kemampuan glukoamilase amobil yang diperoleh dalam menghidrolisis pati.

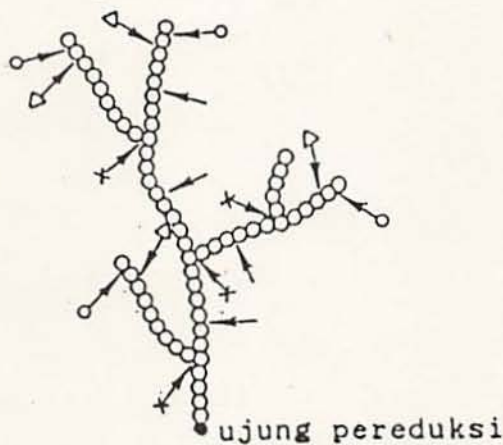
2.4. Manfaat Penelitian

Penelitian ini dapat dikembangkan untuk produksi gula non-sukrosa di Industri, untuk memenuhi kebutuhan gula dari sumber dalam negeri.

BAB II
TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Glukoamilase

Glukoamilase, disebut juga amiloglukosidase, termasuk jenis amilase yang bekerjanya menghidrolisis ikatan glikosidik α -1,4 dari ujung non-pereduksi (*exoenzyme*) secara berurutan, sehingga dibebaskan unit-unit glukosa. Dapat menghidrolisis dan melewati ikatan glikosidik α -1,6, oleh karena itu diperoleh produk akhir glukosa secara kuantitatif. Karena bekerja hanya pada bagian ujung molekul, maka penurunan kekentalan larutan substrat terjadi secara lambat, sedang produksi gula pereduksi berlangsung cepat (Crueger dan Crueger, 1984).



Gambar 2.1. Skema mekanisme hidrolisis pati oleh amilase (Cruege dan Crueger, 1984)

\longleftarrow α -amilase \longleftarrow o gluukoamilase
 \longleftarrow Δ β -amilase \longleftarrow x enzim pemutus cabang.

Glukoamilase jarang ditemukan dalam bakteri. Dihasilkan oleh beberapa genera fungi. Secara komersial didapat dari *Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *A. awamori*, *Rhizopus niveus*, *R. delemar*, *R. formosaensis*, *R. javanicus* serta genera *Endomyces* (Wiseman, 1979). Glukoamilase dari *Aspergillus* paling termostabil, mempunyai temperatur optimum 60°C (pada umumnya amilase 55°C). Pada suhu di bawah 60°C sukar sekali mencegah pertumbuhan mikroba lain dalam campuran reaksi. Karena pertimbangan ini maka glukoamilase dari *Aspergillus* paling unggul di pasaran (Priest, F. G. 1984).

Glukoamilase adalah glikoprotein. Glukoamilase *A. niger* dan *R. delemar* mengandung 13% karbohidrat. Berat molekul berkisar 60.000-100.000. Dilaporkan pula bahwa glukoamilase *Rhizopus* dan *Aspergillus* mengandung manosa, glukosa, galaktosa dan asam uronat (Wiseman, 1985).

Kadang-kadang satu strain menghasilkan beberapa isoenzim glukoamilase. Kemungkinan juga terjadinya isoenzim ini karena modifikasi enzim selama proses fermentasi tiga jenis glukoamilase, akibat kerja protease dan glikosidase yang terdapat pada kondisi eksperimen. Satu dari ketiga glukoamilase tersebut dapat menghidrolisis pati jagung yang masih mentah, sedang dua yang lain hanya bekerja pada molekul pati yang telah digembungkan dengan pemanasan (Crueger dan Crueger, 1984).

Kualitas spora yang digunakan sebagai inokulum

mempengaruhi perolehan enzim dalam produksi glukoamilase dari *A. niger*. Bila spora diproduksi pada medium agar yang kaya suplemen (misalnya dibubuhi ekstrak malt), kecepatan pembentukan glukoamilase akan berkurang pada tiap kali transfer (setelah enam kali transfer, hanya tertinggal 50 % dari aktivitas enzim semula) sedang pembentukan spora tidak menurun. Namun bila spora inokulum diproduksi pada medium minimal, kecepatan pembentukan enzim tetap pada tiap kali transfer, sedang pembentukan spora menurun.

Hal yang menarik pada kebanyakan glukoamilase adalah kemampuannya menyerang dan menghidrolisis granuk-granul pati yang masih mentah. Maka kemungkinan hidrolisis pati tanpa tahap gelatinisasi pada temperatur tinggi. Dalam industri hal ini dapat mengurangi ongkos tinggi karena penggunaan energi yang berlebih (Priest, 1984).

2.2. Lempung

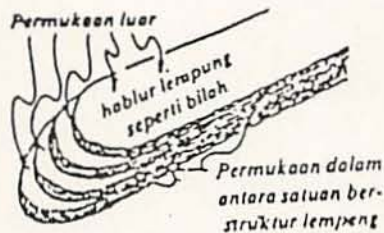
Lempung merupakan bagian penting dari tanah yang berupa senyawa dari alumina dan silika sebagai bentuk mineral bersama-sama dengan senyawa organik didalam tanah yang merupakan unsur pokok yang berpengaruh dalam kebanyakan sifat kimia dan fisika tanah. Lempung menyusun 35 % lebih tekstur tanah.

Ada dua golongan lempung yakni :

1. lempung jenis silikat yang terdapat di daerah sedang (pada daerah pertanian yang luas dan maju)

2. golongan lempung hidrat oksida besi yang ada di daerah tropik dan semi tropik.

Lempung silikat berupa individual koloid yang terdiri dari bentuk lempeng-lempeng, yang satu sama lain membentuk lapisan-lapisan besar, dan bentuk satuannya tergantung pada susunan mineral dan tempat terbentuknya. Tiap butir lempung tersusun oleh sejumlah besar kesatuan unit struktur seperti lempung. Butir hablur individual disebut misel atau inti. Lapisan kation yang menyusun permukaan butir lempung dapat bergabung dengan sejumlah molekul air. Karena kation ini dapat terhidratasi, akibatnya lempung silika banyak mengandung air yang tertambat di antara lapis-lapis yang menyusun suatu misel lempung.



Gambar 2.2. Hablur lempung berbentuk bilah yang terdiri dari permukaan luar dan dalam

Butir-butir lempung merupakan sistem yang terdiri dari dua bagian yang berlainan yaitu :

1. misel yang relatif besar dan tidak larut
2. kumpulan kation yang terikat tidak kuat

Kation-kation ini mudah digantikan oleh ion-ion lain, yang

dikenal sebagai pertukaran ion.

Tanah lempung dianggap mempunyai bentuk amorf, dengan pengujian sinar-x atau mikroskop elektron menunjukkan bahwa butir-butir ini bersifat hablur. Atas dasar sifat hablurnya lempung dibagi menjadi 3 golongan lempung, yakni kaolinit, monmorilonit, dan hidrat mika.

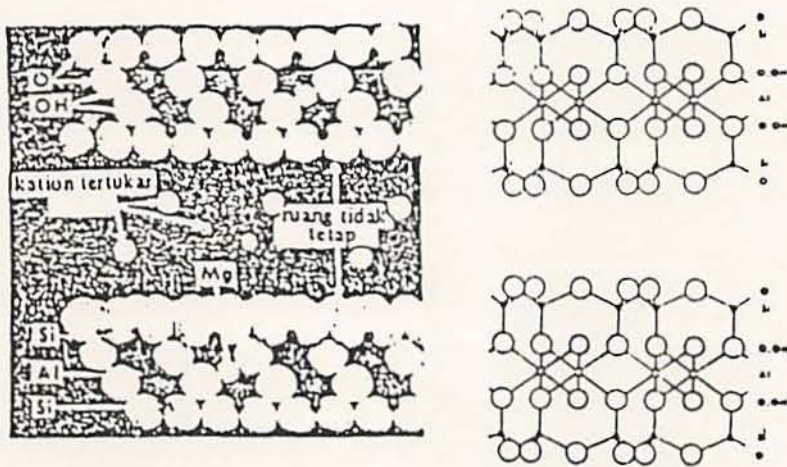
Golongan kaolinit

Hablur seperti lempeng, tersusun atas hablur pipih, satuan ini terdiri dari lapisan yang berganti-ganti yakni lapisan alumina dan lapisan silika. Kedua lapisan satuan kaolinit satu sama lain diikat oleh atom oksigen yang terbagi seimbang oleh atom silika dan alumina dalam lapisan mereka masing-masing. Kesatuan ini selanjutnya diikat lebih kuat oleh penghubung oksigen hidroksil. Akibatnya kisi itu dalam keadaan tidak mengembang, biasanya pengembangan terjadi jika lempung dibasahkan. Kation dan air tidak dapat masuk ke ruang antara satu satuan misel. Jadi permukaan efektif kaolinit terbatas pada permukaan luar, dan menunjukkan rendahnya kemampuan kaolinit mengabsorpsi kation. Kaolinit tidak mudah pecah menjadi lapisan tipis karena satu sama lain sangat kuat terikat.

Golongan Monmorilonit

Hablur seperti keping tersusun atas kesatuan hablur, terdiri dari dua lapisan yaitu lapisan silika dan lapisan alumina, serta atom oksigen yang terikat erat di antara lapisan tersebut. Satuan struktur satu sama lain terikat begitu longgar oleh

penghubung oksigen yang sangat lemah, sehingga kisi hablur seperti puputan yang mengembang sangat mudah, akibatnya pecah menjadi butir-butir yang besarnya mendekati satuan-satuan struktur tunggal yang berukuran diameter 0,01 sampai 1 mikron. Kation dan molekul air dapat bergerak di antara satuan hablur monmorilonit. Pada permukaan luar jumlah butiran jauh lebih besar daripada permukaan dalam. Permukaan dalam juga bermuatan negatif, sehingga memiliki kemampuan mengadsorpsi kation tinggi. Luas permukaan dalam jauh melebihi permukaan hablur luar, kedua hal tersebut mengakibatkan kemampuan pertukaran kation menjadi besar.



Gambar 2.3. Struktur lempung monmorilonit

Golongan Hidrat mika (Illit)

Susunannya mirip monmorilonit. Butir-butirnya jauh lebih besar, dan 15 % silikon yang terdapat pada lapisan silika diganti oleh aluminium. Valensi yang terjadi pada penggantian ini sebagian besar diimbangi oleh kalium yang terletak diantara satuan hablur. Sifat-sifat hidratisasi, adsorpsi ion, mengembang, berkerut, dan plastisitas yang mudah didispersikan berkembang kurang kuat dalam illit. Ukuran dan besarnya terletak di antara kaolinit dan monmorilonit. Bangun satuan hablur mirip seperti monmorilonit, lapisan oktahedral di antara dua lapisan tetrahedral (silika). Ion kalium diikat erat di antara satuan hablur yang menyebabkan tipe struktur mineral menjadi kuat, hal ini menghalangi gerakan air dan kation memasuki ruang antara satuan hablur. Karena itu permukaan dalam dan kemampuan pertukaran ion pada illit jauh lebih kecil dari pada monmorilonit.

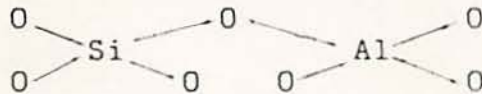
2.2.1. Lempung aktif sebagai resin penukar ion

Sebagai bahan tanah, lempung mengandung senyawa alumina silika hidrat. Kandungan senyawa alumina silika hidrat dalam lempung dapat dimanfaatkan untuk diolah menjadi senyawa alumina silika lainnya, seperti zeolit, bentonit, felspar, kaolin dan bahan-bahan kimia lainnya. (Burhanuddin, 1986).

Lempung yang mula-mula amorf, pada proses aktivasi akan berubah menjadi bentuk kristal yang lebih sempurna dan mempunyai kekristalan yang tinggi, hal ini mengakibatkan ukuran partikel bertambah besar (Bambang, 1989). Sebagai penukar ion yang efektif harus mempunyai sifat-sifat :

1. luas permukaan yang besar
2. kapasitas pertukaran yang tinggi
3. stabil, tahan secara fisik dan kimia
4. mudah diregenerasi

Lempung sangat murah dan mudah didapatkan, mengandung senyawa alumina silika yang mampu mengikat kation dan anion seperti halnya gugus asam dan basa pada resin. Lempung yang sudah diaktifkan mengandung silika 62,64 % dan alumina 43,06 % yang tersusun dalam struktur :

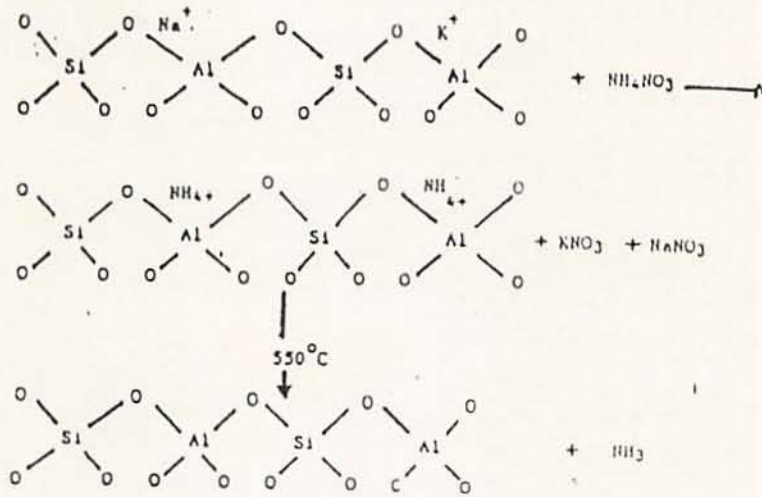


Atas dasar struktur tersebut maka kerapatan elektron pada Al sangat besar sehingga posisi ini sangat elektronegatif, sehingga kation-kation yang terlarut dalam air akan terikat. Kerapatan elektron pada Si sangat kecil , bahkan posisi ini sangat elektropositip sehingga diharapkan anion-anion yang terlarut dalam air akan terikat.

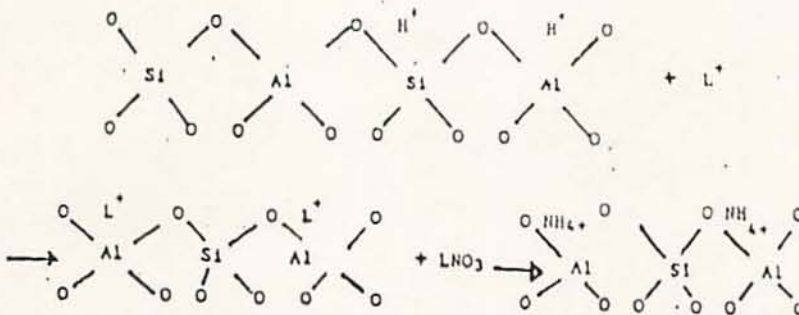
Melihat sifat lempung aktif, yang antara lain mempunyai daya serap yang besar, dapat diproses menjadi bentuk kristal yang lebih sempurna, mengandung senyawa alumina hifrat, serta

Kestabilannya, maka lempung aktif dapat berfungsi sebagai penukar ion, yaitu penukar kation maupun penukar anion. Mekanisme pertukaran kation pada lempung digambarkan sebagai berikut:

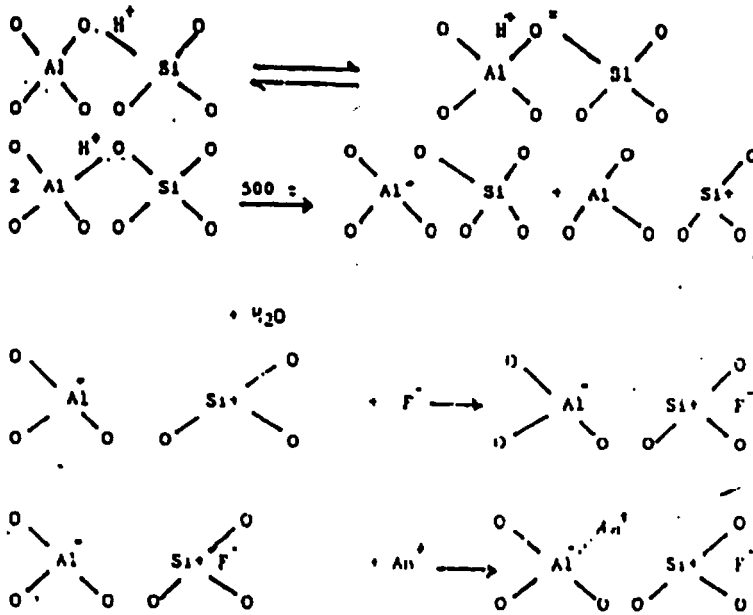
1. Ion amonium (dari NH_4NO_3) sebagai penukar kation



2. Pertukaran dengan kation lain

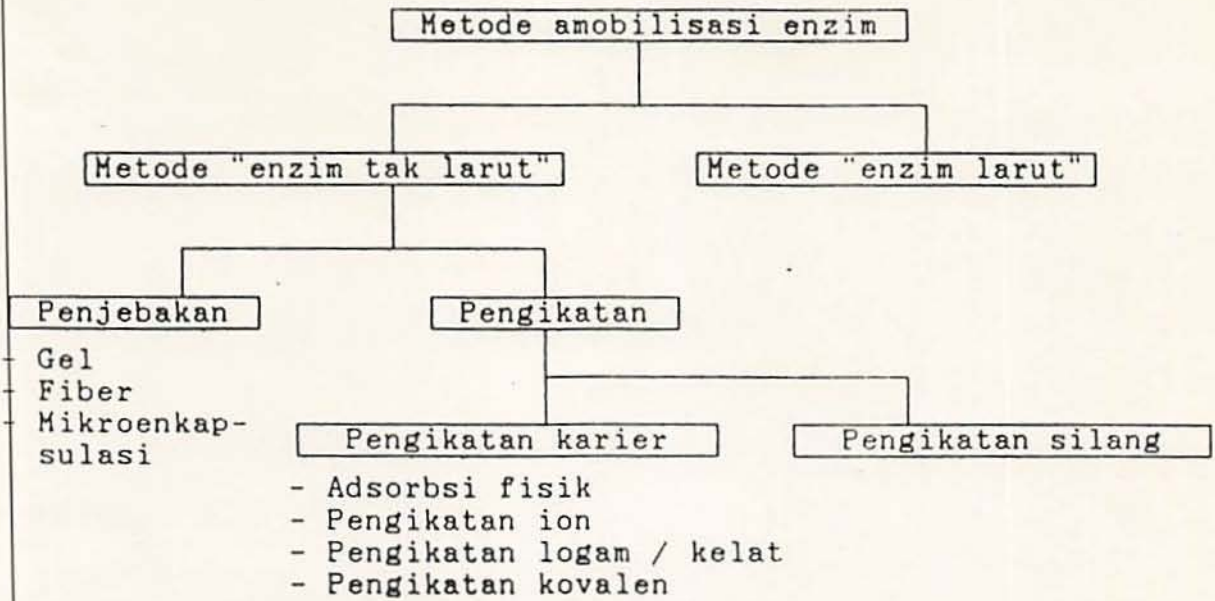


Mekanisme pertukaran anion pada tanah lempung digambarkan sebagai berikut:



2.3. Teknik Amobilisasi Enzim

Amobilisasi enzim didefinisikan sebagai proses untuk menahan pergerakan enzim secara sempurna, umumnya menghasilkan suatu bentuk enzim yang tidak larut air, dan memungkinkan penggunaan ulang enzim tersebut.



Gambar 2.4. Klasifikasi enzim amobil berdasarkan sifat interaksi enzim - materi pendukung dan sifat materi pendukung

Pengikatan enzim pada suatu karier yang tak larut dapat digolongkan atas dasar cara enzim terikat, yaitu adsorpsi fisik, ikatan ionik, ikatan kelat/logam dan ikatan kovalen. Pengikatan karier melalui adsorpsi fisik merupakan metode amobilisasi enzim termudah. Molekul-moleku enzim teradsorpsi secara fisik pada permukaan karier padat, yang dapat dilakukan dengan cara membiarkan larutan enzim kontak dengan karier. Karena tidak ada spesies reaktif yang terlibat dalam prosesnya, maka tidak ada perubahan konformasi enzim setelah amobilisasi, sehingga aktifitas enzim dipertahankan sama seperti bentuk

terlarutnya. Adsorpsi tergantung pada variabel eksperimen, yaitu pH, sifat pelarut, kekuatan ion, jumlah enzim dan adsorben, waktu, serta temperatur.

Variabel-variabel tersebut harus dikontrol, karena ikatan antara protein adsorben relatif lemah (ikatan hidrogen, gaya van der Waals, interaksi hidrofob).

Pada amobilisasi melalui pengikatan ionik, molekul enzim melalui ikatan ion terikat pada materi pendukung padat yang mengandung residu-residu penukar ion. Kadang-kadang juga terlibat adsorpsi fisik. Perbedaan utama antara metode ikatan ion dan adsorpsi fisik adalah kekuatannya. Pada ikatan ion, ikatan enzim-karier lebih kuat dibandingkan adsorpsi fisik, tetapi lebih lemah dibanding ikatan kovalen.

Teknik yang relatif baru adalah penggunaan senyawa logam transisi untuk aktivasi permukaan materi pendukung sehingga dapat bergabung dengan enzim melalui pembentukan kelat. Materi pendukung yang telah dicoba adalah gelas, chitin, celite, asam alginat, gelatin dan selulosa, untuk amobilisasi enzim dan antibiotik.

Metode yang penggunaannya luas adalah amobilisasi enzim dengan ikatan kovalen antara materi pendukung dengan residu pada enzim yang tidak diperlukan untuk kerja katalitik.

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Bahan Penelitian dan Alat

Sampel penelitian meliputi enzim glukoamilase dan bentonit. Glukoamilase diperoleh dari Novo Industry. Untuk selanjutnya yang dimaksud amilase adalah glukoamilase. Bentonit diperoleh dari Kecamatan Punung, Kabupaten Pacitan, Jawa Timur.

Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini apabila tidak disebutkan lain berarti berkualitas pro-analisis. Bahan yang digunakan : NH_4NO_3 , HF, amonium molibdat, NaOH, kalium-natrium tartrat, H_2SO_4 , $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Na_2CO_3 , Na_2SO_4 , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, glukosa, tirosin, asam sitrat, amilum, Na_2HPO_4 .

Alat utama yang dipakai: Spektrofotometer uv/vis 6105.

3.2. Cara Kerja

Pengikatan enzim pada pendukung bentonit dicoba melalui dua cara, yaitu melalui ikatan ion dan adsorpsi fisik. Prosedur aktivasi bentonit untuk dua jenis cara pengikatan ini dirujuk dari penelitian terdahulu. Untuk selanjutnya yang dimaksud dengan *bentonit aktif* adalah bentonit yang diaktivasi untuk mengikat amilase secara fisik, sedang *bentonit penukar kation* adalah bentonit yang diaktivasi untuk mengikat amilase secara ionik.

3.2.2. Pembuatan bentonit penukar kation

Enzim amilase yang digunakan mempunyai pH optimum di bawah 7, sehingga dalam larutan air bermuatan positif. Oleh karena itu pendukung bentonit diaktifkan agar dapat berfungsi sebagai penukar kation dengan ion pasangan H^+ atau NH_4^+ . Bentonit penukar kation yang terbentuk berturut-turut diberi lambang B- H^+ dan B- NH_4^+ .

A. Pembuatan B - H^+

Dilakukan prosedur aktivasi bentonit seperti pada butir 3.2.1. Kemudian bentonit aktif dimasukkan ke dalam kolom yang telah berisi gelas wol pada dasarnya. Dialirkan 100 ml larutan NH_4NO_3 1000 ppm sebagai influen. Kemudian bentonit dipindah ke dalam krus porselin dan dipanaskan $130^{\circ}C$ sampai kering, dilanjutkan pemanasan dalam tanur suhu $550^{\circ}C$ selama 3 jam, dan didinginkan.

B. Pembuatan B - NH_4^+

Dilakukan prosedur pada butir B di atas tanpa pemanasan.

3.2.3. Persiapan amilase

Amilase berupa ekstrak kental yang diperoleh dari Novo Industry, diuji aktivitasnya dan ditentukan kadar proteinnya. Untuk amobilisasi melalui adsorpsi fisik, ekstrak kental yang telah diencerkan pada kadar tertentu* langsung dikontakkan pada

bentonit aktif. Sedang untuk amobilisasi melalui ikatan ionik, ekstrak kental amilase terlebih dahulu ditambah beberapa tetes NaOH 0,1 N sampai mencapai pH tertentu* kemudian diencerkan sampai kadar tertentu* tanpa menggeser harga pH.

Catatan : * pH dan kadar tertentu di sini masih akan ditentukan.

A. Uji aktivitas amilase

Pembuatan pereaksi warna arsenomolibdat : lima gram kristal amonium molibdat dilarutkan dalam 90 ml air, ditambah 4,2 ml H_2SO_4 pekat sambil diaduk, kemudian didinginkan.

Kristal $Na_2HAsO_4 \cdot 7H_2O$ sebanyak 0,6 gram dilarutkan dalam 5 ml air, larutan ini dicampur dengan larutan pertama dan diaduk. Larutan bening yang berwarna kuning ini disimpan dalam botol coklat dan diinkubasi selama 24 - 48 jam pada suhu $37^\circ C$. Setelah itu disimpan dalam lemari es.

Pembuatan larutan Nelson A : satu setengah gram garam Rochelle, 3,0 gram Na_2CO_3 anhidros, 2,0 gram $NaHCO_3$ dan 18,0 gram Na_2SO_4 anhidros dilarutkan dalam air sambil diaduk dan diencerkan hingga volume 100 ml.

Pembuatan larutan Nelson B : dua gram $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ dilarutkan dalam air, ditambahkan 18 gram Na_2SO_4 anhidros, diaduk hingga larut, diteteskan 1-2 tetes H_2SO_4 pekat, dan diencerkan sampai 100 ml.

Pembuatan larutan Cu alkalis : Dicampur 4 volume larutan Nelson A dengan 1 volume larutan Nelson B, dan diaduk.

Larutan ini harus dibuat saat hendak dipakai.

Pembuatan kurva kalibrasi glukosa :

Disiapkan 5 buah larutan glukosa standar, dengan kadar 0,02; 0,03; 0,05 , 0,08, dan 1 mg/ml. Setiap larutan dipipet 0,1 ml ke dalam 5 tabung reaksi, ditambah 1 ml H₂O dan 2 ml pereaksi Cu alkalis, dipanaskan pada penangas air 100°C 10 menit, didinginkan, ditambahkan 2 ml pereaksi warna arsenomolibdat dan dikocok sehingga gelembung gas habis. Ditambah akuades 4,9 ml, dikocok, diukur serapan filtrat yang jernih pada λ 520 nm. Kemudian dibuat grafik kadar glukosa terhadap serapan pada 520 nm.

Uji Aktivitas : Disiapkan dua buah tabung reaksi, diberi tanda B (blangko) dan E (eksperimen). Ke dalam tabung B dimasukkan 0,1 ml larutan enzim yang telah dipanaskan pada 100°C 10 menit. Pada tabung E dimasukkan 0,1 ml larutan amilase yang masih segar. Pada kedua tabung ditambahkan 1 ml larutan amilum 1 % dalam bufer pH 5,5, kemudian diinkubasi pada 40°C selama 10 menit, segera dipanaskan pada penangas air 100°C. Kemudian ditambah 2 ml pereaksi Cu alkalis, dipanaskan 100°C dengan penangas air selama 10 menit, tabung-tabung direndam dalam air dingin, ditambah 2 ml pereaksi warna, dikocok sampai gelembung gas habis, terakhir ditambah 4,9 ml H₂O, dikocok, dan diukur serapannya pada 520 nm.

B. Penentuan kadar protein

Kadar protein ditentukan dengan cara pengukuran serapan larutan pada 280 nm menggunakan spektrofotometer, dan dibandingkan dengan larutan tirosin standar.

Pembuatan kurva kalibrasi tirosin : dibuat larutan tirosin standar dalam HCl 0,2 N, dengan konsentrasi 10, 20, 30, 40 dan 50 $\mu\text{g/ml}$. Dibuat kurva kadar tirosin terhadap serapan pada λ 280 nm.

3.2.4. Penentuan kondisi optimum pengikatan bentonit-amilase

Variabel yang menentukan adsorpsi fisik antara amilase dan bentonit aktif adalah suhu, lama kontak, dan konsentrasi amilase. Sedang variabel yang menentukan ikatan ionik antara bentonit penukar kation dan amilase adalah suhu, lama kontak, konsentrasi amilase, dan pH. Berikut ini ditentukan kondisi optimum tiap variabel tersebut. Di samping itu dalam pembentukan ikatan ionik antara bentonit dan amilase, akan dibandingkan kekuatan ikatan yang terjadi bila menggunakan bentonit B-H^+ dan B-NH_4^+

A. Membandingkan kekuatan bentonit B-NH_4^+ dan B-H^+ dalam mengikat amilase

Disiapkan dua buah tabung reaksi, tabung I diisi 0,25 gram serbuk bentonit B-NH_4^+ dan tabung II diisi 0,25 gram serbuk bentonit B-H^+ . Ke dalam tiap tabung ditambahkan 0,2 ml larutan amilase pH 5, didiamkan 30 menit, kemudian dibilas

dengan 10 ml bufer fosfat sitrat pH 5. Setelah diaduk dengan jumlah pengadukan sama, dipusingkan. Filtrat dipisahkan dan diukur serapannya pada λ 280 nm. Pembilasan diulang empat kali sehingga diperoleh lima buah data serapan bilasan.

B. Variasi suhu

Disiapkan tiga buah tabung reaksi. Ke dalam tiap tabung dimasukkan 0,25 gram bentonit aktif. Tabung reaksi diberi nomor I, II dan III. Suhu pada tabung I diatur sampai 15°C , tabung II suhu 25°C dan tabung III suhu 35°C . Ke dalam tiap tabung ditambahkan 0,2 ml larutan amilase, dibiarkan 30 menit, kemudian ditambah 10 ml aquades dan diaduk dengan jumlah pengadukan yang sama, segera dipusingkan, filtrat dipisahkan dan diukur serapannya pada λ 280 nm.

C. Variasi lama kontak

Disiapkan tujuh buah tabung reaksi, masing-masing diberi tanda 0', 5', 10', 15', 30', 45' dan 60'. Ke dalam tiap tabung dimasukkan 0,25 gram bentonit aktif dan 0,2 ml larutan amilase. Pada tabung yang bertanda 0' segera ditambahkan 10 ml aquades setelah kontak. Sedang pada tabung-tabung yang lain, penambahan 10 ml aquades dilakukan setelah kontak amilase dan bentonit berlangsung selama waktu yang tertera pada tiap tabung (5', 10', 30', 45' dan 60'). Setelah diaduk dengan jumlah pengadukan yang sama, segera dipusingkan, filtrat dipisahkan dan ditentukan serapannya pada λ 280 nm.

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

D. Variasi pH larutan amilase

Disiapkan enam buah tabung reaksi, secara berurutan ditandai pH 4, pH 5, pH 6, pH 7, pH 8. Ke dalam tiap tabung dimasukkan 0,25 gram serbuk bentonit penukar kation. Disiapkan larutan amilase 25% dengan pH 4, 5, 5,5, 6, 7, 8, yang dibuat dengan cara menambah NaOH 0,1 N pada larutan amilase induk sampai diperoleh larutan amilase 25 % pH tertentu. Masing-masing larutan amilase sebanyak 0,2 ml dimasukkan ke dalam tabung berisi bentonit yang sudah disiapkan sesuai dengan tanda yang ada. Dibiarkan terjadi kontak antara bentonit dan amilase dalam semua tabung selama 30 menit, dan ditambahkan 10 ml bufer fosfat sitrat pH tertentu (sesuai dengan pH setiap amilase dalam tabung), diaduk dengan jumlah pengaduk yang sama, dan dipusingkan. Setiap filtrat dipisahkan dan diukur serapannya pada λ 280 nm.

E. Variasi konsentrasi larutan amilase

Disiapkan enam buah tabung reaksi yang berisi 0,25 gram bentonit aktif. Pada tabung diberi tanda I, II, III, IV, V dan VI. Pada tiap tabung ditambahkan larutan amilase yang kadarnya berbeda-beda, yaitu tabung I 100 %, tabung-tabung berikutnya secara berurutan 20 %, 10 %, 7 %, dan 5 %, . Setelah didiamkan 30 menit, tiap tabung ditambah 10 ml aquades dan diaduk dengan jumlah pengadukan yang sama, kemudian dipusingkan. Setiap filtrat ditentukan serapannya

pada 280 nm.

3.2.5. Uji Kekuatan adsorpsi fisik bentonit-amilase

Disiapkan sebuah tabung reaksi yang berisi 0,25 g bentonit aktif, dibiarkan pada suhu optimum. Kemudian ditambahkan 0,2 ml larutan amilase bersuhu optimum, dibiarkan sampai adsorpsi optimum, pada ruang bersuhu optimum. Kemudian dibilas dengan 10 ml akuades bersuhu optimum, diaduk, dipusingkan, dan filtrat diukur serapannya pada λ 280 nm. Pembilasan dengan 10 ml aquades diu-empat kali hingga diperoleh lima data serapan pada 280nm.

3.2.6. Uji kekuatan ikatan ionik bentonit-amilase

Disiapkan empat buah tabung reaksi yang masing-masing berisi 0,25 g bentonit penukar kation, diatur pada suhu optimumnya. Tiap tabung ditambahkan 0,2 ml larutan amilase bersuhu optimum, dibiarkan sampai adsorpsi optimum pada ruangan bersuhu optimum, kemudian dilakukan pembilasan dengan cairan pembilas yang berbeda-beda untuk tiap tabung, yaitu tabung I dibilas dengan 10 ml bufer fosfat-sitrat pH 5,5, tabung II dibilas dengan 10 ml larutan amilum 1,25 % dalam bufer pH 5,5 ; tabung III dibilas dengan 10 ml larutan amilum 2,5 % dalam bufer pH 5,5 ; dan tabung IV dibilas dengan 10 ml larutan amilum 5 % dalam bufer pH 5,5. Setelah dipusingkan, diukur serapan filtrat pada λ 280 nm menggunakan blangko larutan pembilasnya masing-masing. Prosedur pembilasan ini diulang 3 kali, sehingga diperoleh empat data

serapan pada λ 280 nm untuk setiap tabung reaksi.

3.2.7. Uji aktivitas amilase amobil secara sinambung

Ditimbang 4 gram serbuk bentonit penukar kation, dibuat bersuhu optimum, dimasukkan ke dalam gelas Beaker 10 ml yang berisi 3 ml larutan glukamilase bersuhu optimum dan pH optimum. Dibiarkan pada suhu optimum selama waktu kontak optimumnya. Kemudian dimasukkan ke dalam kolom yang bagian bawahnya diberi gelas wol, dengan bantuan 10 ml larutan pati 2,5 % dalam bufer pH optimumnya. Kemudian kolom glukamilase amobil dipindah pada suhu kamar, dan larutan pati dalam kolom dikeluarkan seluruhnya sebagai efluen tetes demi tetes yang ditampung dalam tabung reaksi. Setelah kadar protein efluen ditentukan, segera dipanaskan pada penangas air 100^o C dan ditentukan kadar gulanya dengan metode Somogyi-Nelson.

BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

4.1. Persiapan Glukoamilase

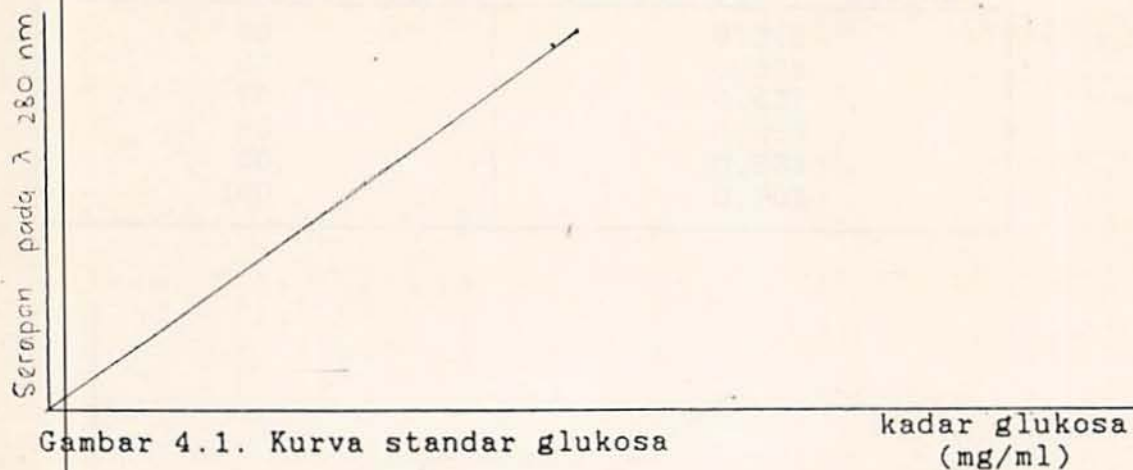
Amilase yang diperoleh dari Novo Industry berupa ekstrak kental berwarna coklat. Untuk percobaan-percobaan selanjutnya bila tak disebut lain, maka yang dimaksud larutan amilase adalah larutan yang berkadar 25 % ekstrak amilase. Jadi larutan amilase adalah pengenceran ekstrak amilase sebanyak empat kali.

4.2. Aktivitas Amilase

Ekstrak amilase ditentukan aktivitasnya menggunakan substrat larutan pati 1 %. Glukosa yang terbentuk dari reaksi enzimatik ditentukan dengan metode Semogyi Nelson, hasilnya tertera pada tabel 4.2, sedang data dan kurva baku glukosa berturut-turut pada tabel 4.1. dan gambar 4.1.

Tabel 3.1. Data serapan larutan glukosa standar pada λ 520 nm

Larutan glukosa (mg / ml)	Serapan pada λ 520 nm
0,00	0.212 (blangko)
0.01	0.264-0,212 = 0.052
0,02	0.322-0.212 = 0,110
0,05	0.335-0,212 = 0,123
0,08	0,464-0,212 = 0,252
1,00	0,583-0,212 = 0.381



Gambar 4.1. Kurva standar glukosa

Tabel 4.2. Data hasil uji aktivitas amilase

Serapan pada λ 520 nm	Glukosa (mg/ml)	Aktivitas, U/ml
0,502 x 10	26,25	26,25

Catatan: Satu unit aktivitas (U) adalah jumlah enzim yang membebaskan 1 mgram gula pereduksi yang dihitung sebagai glukosa per menit pada kondisi percobaan

4.3. Kadar Protein Dalam Ekstrak Amilase

Kadar amilase yang ada dalam larutan diikuti dengan melihat kadar proteinnya, yang ditentukan dengan mengukur serapan larutan pada λ 280 nm, menggunakan standar tirosin. Hasil pengukuran kadar protein ekstrak amilase terdapat pada tabel 4.4, sedang data dan kurva standar tirosin berturut-turut terdapat pada

4.4. Hasil Penentuan Kondisi Optimum Pengikatan Amilase Pada Bentonit

4.4.1. Hasil uji perbandingan daya ikat bentonit $B-NH_4^+$ dan $B-H^+$

Kekuatan ikatan ion yang terbentuk antara bentonit penukar kation bentuk $B-NH_4^+$ dan $B-H^+$ dengan amilase dibandingkan dengan cara mengukur kadar protein yang lolos / terikat dalam filtrat hasil bilasan enzim amobil. Data yang diperoleh pada tabel 4.5.

Tabel 4.5. Data kadar protein yang lolos selama pembilasan amilase amobil dengan pendukung bentonit $B-NH_4^+$ & $B-H^+$

Bentonit	B i l a s a n							
	I		II		III		IV	
	S	P	S	P	S	P	S	P
$B-NH_4^+$	10x 0,630	0,99	5x 0,216	0,13	1x 0,397	0,05	1x 0,337	0,04
$B-H^+$	10x 0,828	0,88	1x 0,584	0,08	1x 0,398	0,05	1x 0,274	0,04

Keterangan: S = Serapan pada panjang gelombang 280 nm
P = Kadar protein (mg/ml)

Data kadar protein yang lolos pada pembilasan enzim amobil dengan pendukung bentonit bentuk $B-H^+$ lebih kecil dibanding bila menggunakan bentonit bentuk $B-NH_4^+$. Maka disimpulkan bahwa pendukung bentonit bentuk $B-H^+$ lebih kuat mengikat amilase daripada bentonit $B-NH_4^+$.

4.4.2. Suhu optimum

Variasi suhu dilakukan untuk menentukan suhu optimum pengikatan amilase oleh bentonit. Dalam hal ini diwakili oleh bentonit aktif. Protein yang terikat dalam filtrat hasil bilasan (dari prosedur butir 3.2.4.B), merupakan protein yang lolos karena tidak teradsorpsi oleh bentonit. Makin kecil kadar protein dalam bilasan berarti semakin baik kondisi suhu yang digunakan. Data yang diperoleh terdapat pada tabel 4.6.

Tabel 4.6. Kadar protein yang lolos selama prosedur pengikatan amilase oleh bentonit pada berbagai suhu.

Suhu	Serapan bilasan pd λ 280 nm	Kadar protein yg lolos mg/ml
15°C	11 x 0,251	0,34
25°C	11 x 0,550	0,86
35°C	11 x 0,621	0,97

Pada kisaran suhu yang dicoba, semakin tinggi suhu maka pengikatan amilase bentonit semakin rendah.

4.4.3. Lama kontak optimum

Variasi lama kontak amilase dan bentonit dilakukan untuk menentukan waktu yang diperlukan oleh bentonit untuk mengikat amilase secara optimum. Hal ini ditentukan atas dasar pengukuran kadar protein yang terikat dalam bilasan (dari prosedur butir 3.2.4.B). Data yang diperoleh tertera pada tabel 4.7 dan tabel

4.8.

Tabel 4.7. Kadar protein yang lolos selama prosedur pengikatan amilase oleh bentonit penukar kation pada lama kontak yang berbeda

Lama kontak (menit)	Serapan bilasan pada λ 280 nm	Kadar protein yang lolos (mg/ml)
10	11 x 0,264	0,36
20	11 x 0,246	0,34
30	11 x 0,242	0,33
40	11 x 0,261	0,35
50	11 x 0,250	0,34

Lama kontak 30 menit memberikan data kadar protein yang lolos paling kecil, jadi waktu optimum kontak bentonit aktif kation dan amilase untuk mengalahkan spektrum adalah 30 menit .

Tabel 4.8. Kadar protein yang lolos selama prosedur pengikatan amilase oleh bentonit aktif pada lama kontak yang berbeda-beda.

Lama kontak (menit)	Serapan bilasan pada λ 280 nm	Kadar protein yang lolos (mg/ml)
10	11 x 0,327	0,47
20	11 x 0,320	0,46
30	11 x 0,305	0,44
40	11 x 0,311	0,45
50	11 x 0,315	0,45

4.4.4. pH optimum

Variasi pH amilase dilakukan untuk menentukan pH optimum bagi pengikatan secara ionik oleh bentonit penukar kation. Dalam hal ini yang diukur adalah jumlah protein yang lolos dalam

bilasan, setelah prosedur pengikatan amilase oleh bentonit. Data yang diperoleh tertera pada tabel 4.9..

Tabel 4.9. Kadar protein yang lolos selama prosedur pengikatan amilase oleh bentonit penukar kation pada berbagai pH.

pH	Serapan pada λ 280 nm		Kadar protein yang lolos (mg/ml)	
	bilasan I	bilasan II	pada bilasan I	pada bilasan II
4	7 x 0,383	7 x 0,447	0,37	0,44
5	7 x 0,334	7 x 0,267	0,31	0,23
5,5	7 x 0,302	7 x 0,261	0,28	0,22
6	7 x 0,450	7 x 0,455	0,45	0,45
7	7 x 3,383	7 x 0,552	0,37	0,55
8	7 x 0,357	7 x 0,524	0,35	0,60

Dari data tersebut, disimpulkan bahwa pH 5,5 adalah kondisi terbaik bagi terbentuknya ikatan ionik antara amilase dan bentonit penukar kation, karena data protein yang lolos paling kecil.

4.4.5. Variasi konsentrasi larutan amilase

Untuk mengetahui apakah ada pengaruh konsentrasi amilase terhadap efektifitas pengikatannya oleh bentonit, maka dilakukan variasi konsentrasi. Efektifitas pengikatan ini ditentukan atas dasar selisih jumlah protein yang terdapat dalam larutan amilase sebelum dan setelah kontak dengan bentonit. Data yang didapat pada tabel 4.10.

Tabel 4.10. Kadar protein yang diadsorpsi oleh bentonit pada prosedur pengikatan menggunakan kadar larutan amilase berbeda-beda

Kadar Amilase (%)	Serapan bilasan pada λ 280 nm		Protein yang diadsorpsi	
	sebelum kontak bentonit	setelah kontak bentonit	Δ serapan	kadar (mg/ml)
100	0,712	0,583	0,129	0,015
20	0,146	0,111	0,035	0,003
10	0,080	0,051	0,029	0,002
7	0,064	0,034	0,030	0,002
5	0,056	0,008	0,031	0,002

Setelah diketahui kondisi-kondisi optimum untuk pengikatan amilase oleh bentonit, maka dilakukan prosedur amobilisasi menggunakan kondisi optimum tersebut. Selanjutnya amilase amobil yang diperoleh diuji kekuatan ikatannya.

4.5. Hasil Uji Kekuatan Adsorpsi Fisik Bentonit-Amilase

Kekuatan ikatan adsorpsi fisik yang terjadi antara bentonit dan amilase diuji dengan cara melakukan pembilasan berulang kali menggunakan pembilas aquades.

Tabel 4.11. Protein yang lolos dalam bilasan I s/d V selama pembilasan amilase amobil (adsorpsi fisik)

Bilasan	Serapan pada λ 280 nm	Kadar protein yang lolos (mg/ml)
I	10 x 0,731	1,04
II	10 x 0,200	0,23
III	1 x 0,280	0,03
IV	1 x 0,810	0,12
V	10 x 0,199	0,17

Dari data kadar protein yang lolos, maupun bahwa adsorpsi fisik amilase oleh bentonit mempunyai daya ikat yang lemah. Pada bilasan IV dan V protein yang setelah diikat lolos lagi. Maka metode pengikatan secara adsorpsi fisik tidak dipilih dalam penelitian ini.

4.5. Hasil Uji Kekuatan Ikatan Ion Pada Bentonit-Amilase

Kekuatan ikatan ion antara bentonit penukar kation dan amilase pada pH 5,5 (bermuatan negatif) diuji dengan cara melakukan pembilasan berulang kali. Cairan pembilas yang dipakai adalah bufer fosfat-sitrat pH 5,5. Dicoba pula cairan pembilas larutan amilum berbagai konsentrasi dalam bufer fosfat-sitrat pH 5,5. Hal ini sesuai dengan aplikasinya, yaitu larutan amilum dialirkan sepanjang kolom amilase amobil. Kolom amilase amobil dikatakan baik bila larutan amilum yang dialirkan sebagai influen, keluar dari kolom sudah dikonversi menjadi gula, sedang amilase tetap tertahan dalam kolom.

Hasil penentuan amilase (diukur sebagai protein) yang lolos (terbawa bilasan), selama pembilasan amilase amobil yang dibuat melalui ikatan ionik terdapat pada tabel 4.11.

Tabel 4.12. Protein yang lolos pada bilasan I - IV menggunakan pembilas larutan amilum dengan variasi kadar, sela-pembilasan amilase amobil (ikatan ionik)

Larutan amilum dalam bufer pH 5,5 (%)	B i l a s a n							
	I		II		III		IV	
	S	P	S	P	S	P	S	P
0	10 x 0,210	0,24	0	0	0	0	0	0
1,25	1 x 0,645	0,09	0	0	0	0	0	0
2,50	1 x 0,176	0,02	0	0	0	0	0	0

Keterangan: S = Serapan pada 280 nm, P = Kadar protein (mg/ml)

Pada tabel 4.11 nampak bahwa bilasan II, III dan IV tidak menunjukkan adanya protein yang lolos, berarti amilase diikat kuat oleh bentonit penukar kation bentuk B-H⁺. Adapun protein yang terikat pada bilasan I merupakan kelebihan enzim, karena dalam prosedur amobilisasi enzim dibuat berlebih.

Dari hasil uji kekuatan ikatan pada tabel 4.6, 4.11 dan 4.12 maka dapat disimpulkan bahwa bentonit penukar kation B-H⁺ yang paling kuat mengikat amilase, sehingga bentuk ini yang dipilih dalam penelitian. Untuk selanjutnya yang dimaksud bentonit adalah bentuk B-H⁺.

4.7. Hasil Uji Aktivitas Amilase Amobil Secara Sinambung

Kolom amilase amobil, dibuat dari 4 gram bentonit yang dikontakkan dengan 3 ml larutan amilase pH 5,5, diuji dengan mengalirkan larutan amilum 2,5 % dalam bufer pH 5,5 sebagai influen. Cairan yang menetes dari kolom ditampung seluruhnya.

Diperoleh 8 ml efluen, yang ditentukan kadar gulanya dengan metode Somogyi Nelson. Kemudian kolom amilase diuji sekali lagi dengan mengalirkan amilase dalam jumlah yang sama, diperoleh efluen sebanyak 8 ml. Hasil uji kadar gula pada kedua efluen tertera pada tabel 4.13.

Protein yang tidak teradsorpsi oleh bentonit selama prosedur amobilisasi akan lolos bersama efluen pada uji aktivitas di atas. Hasil penentuan kadar protein yang lolos terdapat pada tabel 4.14.

Tabel 4.13. Kadar gula efluen pada uji aktivitas amilase amobil secara sinambung

Efluen	Volume (ml)	Serapan pada 520 nm	Kadar glukosa mg/ml
I	8	4 x 0,695	4,69
II	8	5 x 0,622	5,25

Tiap ml influen mengandung 25 mg pati. Setelah dialirkan ke dalam kolom amilase amobil (berukuran panjang 2 cm, diameter 3 cm), efluen yang keluar dari kolom mengandung glukosa sejumlah: $\frac{4,69 + 5,25}{2} = 4,97$ mg/ml.

Jadi pati yang dikonversi menjadi gula pereduksi adalah :

$$\frac{4,97 \text{ mg}}{25 \text{ mg}} \times 100 \% = 19,88 \%$$

Derajat konversi sebesar 19,88 % dapat ditingkatkan dengan menambah ukuran kolom amilase amobil, yang pada kesempatan

penelitian kali ini belum dilakukan karena kendala waktu dan lain-lain.

Tabel 4.14. Data hasil penentuan kadar protein yang lolos dalam efluen selama uji aktivitas kolom amilase amobil

Efluen	Serapan pada 280 nm	Kadar protein, mg
I	0,382 x 10 ¹	5,06
II	0,317 x 10	0,42

Protein yang lolos dalam efluen I masih tinggi, ini merupakan kelebihan protein yang tidak diikat oleh bentonit, karena dalam prosedur amobilisasi kadar enzim dibuat berlebih. Pada efluen II, kadar protein sudah menurun drastis, menunjukkan bahwa sebagian besar protein terikat oleh bentonit.

Efluen II yang lebih kecil kadar proteinnya menunjukkan aktivitas yang lebih tinggi dibanding efluen I. Berdasarkan kenyataan ini dapat diduga bahwa protein yang lolos pada efluen bukan amilase, melainkan protein lain yang merupakan inhibitor bagi amilase, atau enzim lain yang bekerjanya berlawanan dengan amilase.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Dari hasil penelitian dan pembahasan disimpulkan:

1. bentonit dapat digunakan sebagai materi pendukung untuk pembuatan glukamilase amobil, dalam bentuk *penukar kation* $B-H^+$,
2. kondisi optimum untuk pengikatan glukamilase oleh bentonit adalah pH 5,5; suhu $25^{\circ}C$; dan lama kontak 30 menit,
3. kolom glukamilase amobil yang diperoleh dengan ukuran tinggi 1 cm dan diameter 2,5 cm, mempunyai kemampuan menghidrolisis pati menjadi gula dengan derajat konv^er^si 19,88 %.

5.2. Saran

Berdasarkan hasil penlitian, maka disarankan:

1. melanjutkan penelitian untuk menentukan ukuran kolom glukamilase amobil yang dapat menghidrolisis pati menjadi glukosa dengan derajat konversi 100 % ,
2. mengembangkan metode tersebut untuk skala industri.

DAFTAR PUSTAKA

- Burhanuddin, 1986, *Status Pengembangan Tanah Lempung*, BBPT, Jakarta, p. 1-13.
- Chibata, L., 1978, *Immobilized Enzymes. Research and Development*, Kodansha, p. 9-13.
- Christina, S. S., 1989, *Lempung Sebagai Resin Penukar Kation dan Anion Dalam Proses Penjernihan Air Limbah Tepung Tapioka*, Tesis, Fakultas MIPA UGM, Yogyakarta.
- Crueger, W. dan Crueger, A., 1984, *Biotechnology, A Textbook of Industrial Microbiology*, Sinauer Associates, Inc., Sunderland, p. 163-170.
- Kasmadi, I. S. dkk., 1989, *Tanah Lempung Aktif Sebagai Resin Penukar Ion*.
- Priest, F. G., 1984, *Extracellular Enzymes*, van Norstrand Reinhold (UK), England.

- Setiadji, A. B. H., 1989, *Pengolahan Air Sungai Dalam Rangka Pelestarian Lingkungan*, Fakultas MIPA UGM, Yogyakarta, p. 1-5, 12-13.
- Stryer, L., 1981, *Biochemistry*. Second Edition, W. H. Freeman and Company, New York.
- Tjokroadikusumo, P. S., 1986, *HFS dan Industri Ubi Kayu Lainnya*, PT. Gramedia, Jakarta, p. 4, 57.
- Wilson, K. dan Goulding, K. H., 1986, *Biologist's Guide to Principles and Techniques of Practical Biochemistry*, Third Edition, London.
- Wiseman, A., 1985, *Handbook of Enzymes Biotechnology*, Second Edition, Ellis Horwood Ltd., England, p. 145-201.
- Wisman, A., 1979, *Topics in Enzymes and Fermentation Biotechnology*, Volume 3, Ellis Horwood Ltd., England, p. 47-55.

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA